

Preisträger 2013 – Rudolf-Buchheim-Preis



Andreas Bock (geb. am 25. März 1984, Bonn)
2003-2008 Studium der Pharmazie in Bonn und Valencia, Spanien
2009 Approbation als Apotheker
2009-dato Promotion bei Herrn Prof. Dr. med. K.Mohr, Pharmakologie und Toxikologie,
Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn

Biologische Bedeutung der allosterischen Bindungsstelle eines G-Protein gekoppelten

Rezeptors

Andreas Bock

Abteilung für Pharmakologie & Toxikologie, Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn

G-Protein gekoppelte, heptahelikale Transmembranrezeptoren (GPCRs) bilden die größte Gruppe integraler Zellmembranproteine und sind an der Steuerung nahezu jedes physiologischen Prozesses im Menschen beteiligt. Die hohe therapeutische Bedeutung dieser Rezeptoren wird deutlich durch die große Anzahl an GPCR-modulierenden Arzneistoffen. Konventionelle Vertreter binden sich an die Bindungsstelle des endogenen Liganden (orthosterische Bindungsstelle). Es wird zunehmend offensichtlich, dass GPCRs neben der orthosterischen Bindungsstelle, die in vielen Rezeptoren transmembranär lokalisiert ist, mindestens noch eine weitere, extrazelluläre, allosterische Bindungsstelle besitzen. Obwohl experimentell für viele GPCRs selektive allosterische Liganden verfügbar sind, ist die biologische Funktion der allosterischen Bindungsstellen bisher unklar.

GPCRs zeichnen sich aus einerseits durch eine hohe strukturelle Homologie im Transmembranbereich und andererseits durch die Erkennung extrazellulärer Liganden unterschiedlichster Struktur (biogene Amine, anorganische Ionen, Peptide, Fettsäuren, Photon/Retinal u.a.). Die Rezeptoren interagieren nicht nur mit verschiedenen Klassen der namensgebenden G-Proteine (G_i , G_s , $G_{q/11}$, $G_{12/13}$), sondern auch mit β -Arrestin, GPCR-Kinasen (GRKs) und zytosolischen Gerüstproteinen. Die promiskuitive Kopplung eines GPCR an

unterschiedliche intrazelluläre Proteine erfordert verschiedene aktive Rezeptorkonformationen, die miteinander in einem flexiblen Gleichgewicht stehen. Die strukturellen Grundlagen für die Lage und die Beeinflussung dieses Gleichgewichts sind weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir den Einfluss der allosterischen Bindungsstelle auf die intrazelluläre Signalwegaktivierung am Modell des muskarinischen M_2 Acetylcholinrezeptors [1]. Der M_2 Rezeptor gilt als Leitrezeptor für die Untersuchung allosterischer Modulation an Neurotransmitter-GPCRs, da die Lokalisation und Struktur seiner allosterischen Bindungsstelle recht genau bekannt sind (Abb. 1a). Für die meisten Experimente wurde das unmarkierte Rezeptorprotein verwendet, um den natürlichen Konformationswechsel des Rezeptors nicht zu beeinflussen. Mit Hilfe von bitopischen orthosterischen/allosterischen Agonisten [2] wurde der Rezeptor *von der orthosterischen Bindungsstelle aus aktiviert* und zugleich die *Beweglichkeit der extrazellulären, allosterischen Domänen in unterschiedlichem Ausmaß gehemmt*. Diese maßgeschneiderten „dualsterischen“ Agonisten bestehen aus dem orthosterischen, hochaffinen Agonisten Iperoxo [3] und allosterischen Fragmenten unterschiedlicher Größe und Affinität, die über Methylenketten verschiedener Länge mit Iperoxo kovalent verbunden sind (Abb. 1b).

Der M_2 Rezeptor ist in der Lage, inhibitorische G_i - und stimulatorische G_s -Proteine zu aktivieren (Abb. 1c). Der endogene Agonist Acetylcholin (ACh) und Iperoxo zeigen eine maximale Aktivierung beider Signalwege, der G_s -Signalweg wird jedoch erst bei höheren Konzentrationen der Agonisten angeschaltet (Abb. 2a,b). Im Unterschied dazu aktivieren nahezu alle untersuchten dualsterischen Agonisten präferentiell nur den G_i -Signalweg, sie sind sog. „ G_i -biased agonists“. Es zeigte sich eine deutliche Beziehung zwischen der Struktur des Liganden und Ausmaß des „Bias“ (Abb. 2c): *je voluminöser der allosterische Baustein und je kürzer die verknüpfende Methylenkette, desto geringer ist die Aktivierung des G_s -Signalweges und desto größer ist die Präferenz für den G_i -Signalweg*. Der „Bias“ lässt sich durch das Verlängern der Zwischenkette, also dem Vergrößern des Abstandes zwischen beiden Bausteinen, vermindern (Abb. 2c, vergl. I-6-N und I-8-N).

Die graphische Auftragung der Maximaleffekte der dualsterischen Agonisten auf dem G_i -Signalweg gegen den G_s -Signalweg beider Rezeptoren folgt einem hyperbolischen Verlauf (Abb. 2d). Dies zeigt, dass die G_s -kompetente Rezeptorkonformation über eine Intermediärkonformation mit voller intrinsischer G_i -Aktivität erreicht wird. Raumschaffende Mutagenese eines einzelnen am Übergang zwischen orthosterischer und allosterischer Bindungsstelle lokalisierten Epitopes (Trp422Ala, siehe Abb. 1a) „entfesselt“ die Fähigkeit der dualsterischen Agonisten zur Signalwegaktivierung [1].

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre G-Proteinkopplung des M_2 Rezeptors bestimmt wird durch das Ausmaß der Bewegung extrazellulärer allosterischer Domänen. Die G-Proteinkopplung ist hierarchisch: ausgelöst durch eine orthosterische Aktivierung des Rezeptors erlaubt eine „Standardbewegung“ der allosterischen Bindungsstelle intrazelluläre G_i -Kopplung; erst eine erweiterte extrazelluläre Bewegung ermöglicht intrazelluläre G_s -Kopplung. Die allosterische Bindungsstelle „lotst“ demnach die intrazelluläre G-Proteinkopplung. Diese Erkenntnis bietet die Möglichkeit für ein rationelles „Design“ von signalwegselektiven Substanzen, die sich therapeutisch möglicherweise als günstig erweisen. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft der GPCRs mag vermutet werden, dass die Einbindung in die Feinregulierung von GPCR-Signalwegen ein generelles biologisches Prinzip der allosterischen Rezeptorareale darstellt.

Literatur

[1] Bock, A. *et al.* (2012) The allosteric vestibule of a seven transmembrane helical receptor controls G-protein coupling. *Nat Commun* 3:1044 doi: 10.1038/ncomms2028.

[2] Antony, J. *et al.* Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signaling pathway selectivity. *FASEB J.* **23**, 442–450 (2009).

[3] Schrage, R. *et al.* (2012) Agonists with supraphysiological efficacy at the muscarinic M₂ acetylcholine receptor. *Br J Pharmacol* doi: 10.1111/bph.12003

Danksagung

Mein Dank gilt den Profs. Dr. Marco De Amici (Mailand, Italien), Dr. Ulrike Holzgrabe (Würzburg), Dr. Carsten Hoffmann (Würzburg), Dr. Evi Kostenis (Bonn) und deren Arbeitsgruppen, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Korrespondenzadresse:

Andreas Bock

Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie

Pharmazeutisches Institut

Universität Bonn

Gerhard-Domagk-Straße 3

D-53121 Bonn

Tel.: 0228-73-6445

Fax: 0228-73-9215

a.bock@uni-bonn.de

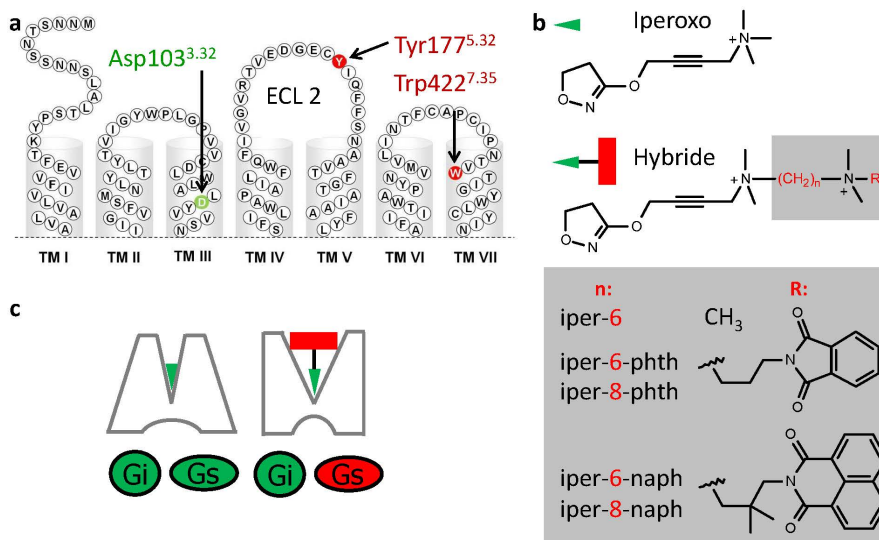


Abbildung 1: Pharmakologische Werkzeuge zur Aufklärung der biologischen Funktion der allosterischen Bindungsstelle.

(a) Ausschnitt der Primärstruktur des M₂ Rezeptors. Grün: orthosterisches Epitop. Rot: allosterische Epitope. (b) Konstruktionsprinzip dualistischer Agonisten aus dem orthosterischen Agonisten Iperoxo und inaktiven allosterischen Fragmenten unterschiedlicher Größe (phth und naph) kovalent verbunden durch Hexamethylen- oder Oktamethylenketten. (c) Orthosterische (links) und dualistische Bindungstopographie (rechts) am M₂ Rezeptor und nachfolgende Signalwegaktivierung über inhibitorische G_i- oder stimulatorische G_s-Proteine. Grünes Dreieck: Iperoxo, rotes Rechteck: allosterisches Fragment.

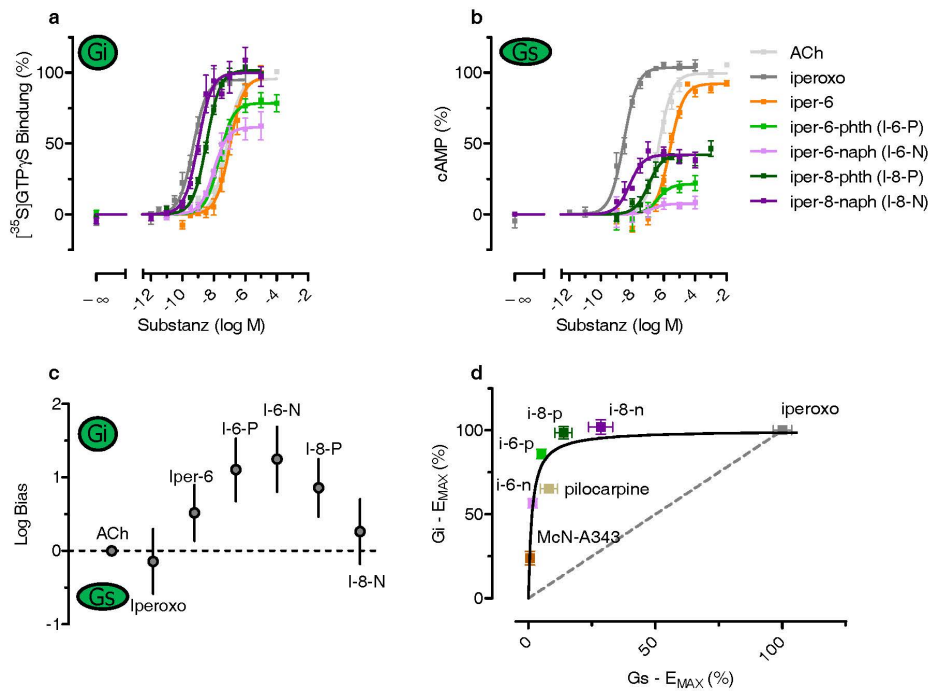


Abbildung 2: „Allosterisches“ Volumen führt zur Signalwegeselektivität.

(a) G_i-Aktivierung wird repräsentiert durch Ligand-abhängige Bindung von $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ in Homogenaten von CHO-M₂ Zellen. **(b)** G_s-Aktivierung wird repräsentiert durch Ligand-abhängige Akkumulation von intrazellulären cAMP in CHO-M₂ Zellen nach Vorbehandlung mit Pertussis toxin. **(c)** Quantifizierung der Agonistwirkungen auf beiden Signalwegen zeigt strukturabhängige Signalwegeselektivität („Bias“). **(d)** Die G-Proteinkopplung des M₂ Rezeptors ist hierarchisch. Maximaleffekte sättigender Konzentrationen der angegebenen Agonisten auf beiden Signalwegen ergeben eine hyperbolische Beziehung: G_i-Aktivierung geht G_s-Aktivierung voraus.